

氏 名	石本 尚大
学 位 の 種 類	博士（創薬科学）
学 位 記 番 号	医薬保博甲第 169
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 22 日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第 4 条第 1 項）
学位授与の題目	有機カチオン膜輸送体による神経分化とミクログリア活性化の制御
論 文 審 査 委 員	主査 加藤 将夫 副査 金田 勝幸 副査 倉石 貴透 副査 檜井 栄一 副査 中道 範隆

学位論文要旨

有機カチオン膜輸送体による神経分化とミクログリア活性化の制御

**Regulation of Neuronal Differentiation and Microglial Activation
by Organic Cation Transporter**

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科
創薬科学専攻
分子薬物治療学研究室

石本 尚大

Abstract

Neural stem cells (NSCs) and microglia play important roles in brain homeostasis. The present study focused on membrane transporter OCTN1/SLC22A4 as a candidate regulator of cellular function in NSCs and microglia. It was previously demonstrated that OCTN1-mediated uptake of ergothioneine (ERGO) promotes neuronal differentiation of NSCs via an unidentified mechanism(s). Thereby, the present study tried to clarify the mechanism(s) underlying promotion of neuronal differentiation by ERGO. Exposure of cultured NSCs to ERGO increased phosphorylation of S6K1 (Thr389), which is a downstream effector of mTORC1, induced expression of neurotrophin 5 (NT5), and then promoted neuronal differentiation, suggesting that ERGO may promote neuronal differentiation via activation of S6K1 (Thr389)/NT5 signaling in NSCs. In microglia, on the other hand, functional expression of OCTN1 has not yet been examined, so was attempted to be clarified to obtain insight into physiological role of OCTN1 in microglia. Primary cultured microglia (WT-PMG) exhibited time-dependent uptake of ERGO, whereas the uptake was not observed in cultured microglia from *octn1*-deficient mice (*octn1*^{-/-}-PMG), demonstrating that OCTN1 is functionally expressed in microglia. Exposure of WT-PMG to ERGO led to a significant decrease in cellular hypertrophy by LPS-stimulation. The expression of mRNA for IL-1 β in *octn1*^{-/-}-PMG after LPS-treatment was significantly high compared to WT-PMG. Thus, OCTN1 may negatively regulate microglial activation. Organic cation transporter OCTN1 could be a possible candidate target for treatment and/or prevention of certain neuropsychiatric disorders.

要旨

【序論】 神経細胞を新たに生み出す神経幹細胞(NSCs)及び脳の免疫・炎症を制御するミクログリアは、脳の恒常性維持に重要な役割を果たしており、その機能異常は種々の精神神経疾患の発症や増悪に関与する。したがって、NSCs及びMGの機能制御は、精神神経疾患の治療や予防に有用である。本研究は、NSCs及びMGの機能を制御する標的分子として、NSCs及びMGに共通して発現する膜輸

送体に着目した。両細胞に共通に発現する膜輸送体を介して細胞機能を同時に制御できれば、精神神経疾患の相乗的な治療効果が期待できる(Fig. 1)。また、膜受容体の場合は、一過性の速い細胞内シグナル伝達の活性化が起きるが、一方で、膜輸送体は膜内外での基質の濃度差を調節するため、膜受容体よりも長期的な細胞機能調節に優れると考えられる。膜輸送体OCTN1/SLC22A4は、NSCsにおいて有機カチオン膜輸送体の中で顕著に発現が高く(Fig. 2A)¹⁾、末梢の

免疫細胞マクロファージにおいても発現するためMGにも発現している可能性が高い。また、*octn1* 遺伝子欠損マウスの胎児脳において、MGマーカーであるCD11bの発現は、野生型マウ

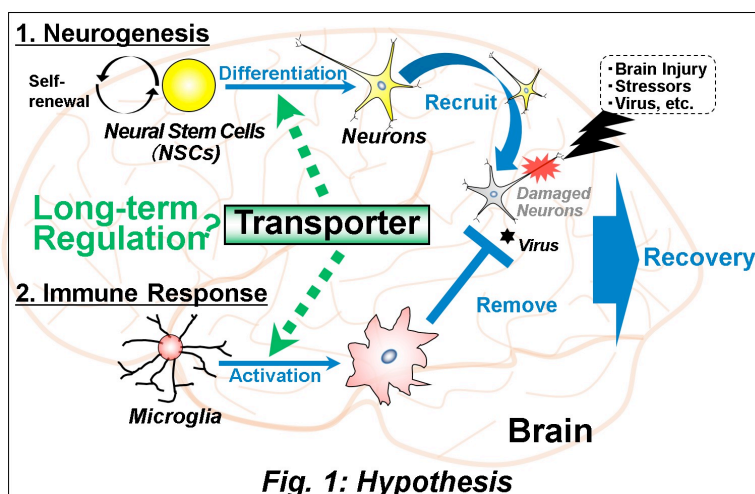


Fig. 1: Hypothesis

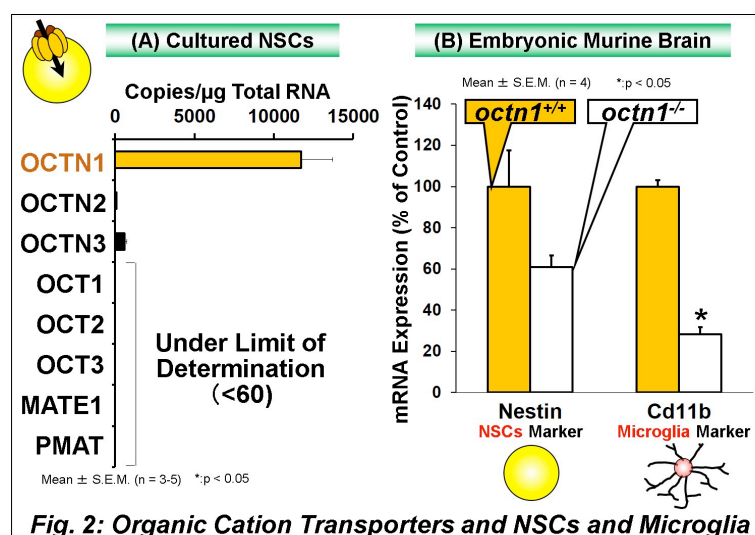


Fig. 2: Organic Cation Transporters and NSCs and Microglia

スと比較して有意に低く (Fig. 2B)、OCTN1 が MG の機能を制御する可能性がある。

NSCs において、OCTN1 は典型的基質である食餌由来抗酸化物質 ergothioneine (ERGO) の細胞内への取り込み、ERGO は神経分化を促進する¹⁾。しかし、その詳細な機序は不明である。そこで、ERGO による OCTN1 を介した NSCs の神経分化促進の作用機序解明を試みた。一方、MG では OCTN1 の機能的な発現が知られていないため、まず OCTN1 が機能的に発現していることを確認し、次に MG の免疫能を制御する可能性について検討した。本研究は、有機カチオン膜輸送体 OCTN1 を介した NSCs 及び MG の機能制御機構について検討し、精神神経疾患の治療や予防に新たな知見を得ることを目的とした。

【本論】

1. 膜輸送体 OCTN1 による神経幹細胞の機能制御

まず、NSCs において OCTN1 を介した ERGO の取り込みによる神経分化促進のメカニズムについて検討した。ERGO は bHLH 型転写因子 Math1 を誘導するため、同様に Math1 を誘導する神経栄養因子シグナルに着目した。初代培養 NSCs に対する ERGO の 9 日間の曝露後、RT-PCR により神経栄養因子の発現を網羅的に解析すると、NT5 の発現のみが有意に増加した。さらに、NSCs に対して ERGO を短時間曝露すると、12 時間で NT5 mRNA の発現が有意に増加し、24 時間で Math1 の発現が増加した。曝露後 24 時間で NSCs を神経細胞やグリア細胞に分化させ、免疫染色を行うと、ERGO 添加群において、神経細胞マーカー β III-tubulin 陽性細胞数が対照群と比較して有意に高かった。さらには、NT5 の受容体 TrkB の阻害剤である GNF5837 は、ERGO による β III-tubulin 陽性細胞数の増加を有意に抑制した。以上より、ERGO は、NT5/TrkB シグナルの活性化を介して NSCs の神経分化を促進することが示唆された。次に、ERGO による NT5 誘導の上流を検討した。ERGO はアミノ酸であるため、アミノ酸センサーである mTORC1 シグナルに着目した。NSCs に対する ERGO の曝露は、mTOR 及び mTORC1 シグナル下流の S6K1 のリン酸化を有意に増加させ神経分化を促進させたが、mTORC1 シグナルの阻害剤 rapamycin は、ERGO による mTOR と S6K1 のリン酸化の増加及び神経分化の促進を有意に抑制させた。また、ERGO による神経栄養因子及び mTORC1 シグナルの経時的な活性化を評価すると、曝露後 1 時間で、S6K1 (Thr389) がリン酸化され、6 時間で mTOR がリン酸化され、12 時間で NT5 が誘導され、24 時間で NSCs の神経分化能が上昇した。また、マウスに対する ERGO の経口投与は、投与後 2 日で NSCs が豊富に存在する海馬歯状回 (DG) の S6K1 (Thr389) のリン酸化を増加させ、19 日後に S6K1 (Thr389) 及び TrkB のリン酸化及び NT5 の発現を有意に増加させた。以上の結果より、ERGO は、mTORC1 シグナルの中でも特に、S6K1 (Thr389) を短時間で活性化し、NT5/TrkB の活性化を介して神経分化を促進することが推察できる (Fig. 3)。マウスに対する ERGO の経口投与が、DG の神経新生

の促進及び抗うつ薬様作用を示す²⁾が、ERGO による S6K1 (Thr389) 及び NT5/TrkB の活性化が関与している可能性がある。本研究より見出した、ERGO の作用標的として考えられる S6K1 (Thr389) 及び NT5 は、既存の精神神経疾患治療薬の標的とは異なるため、既存の治療薬と併用することによる相乗効果が期待できるかもしれない。また、現在のところ、S6K1 の

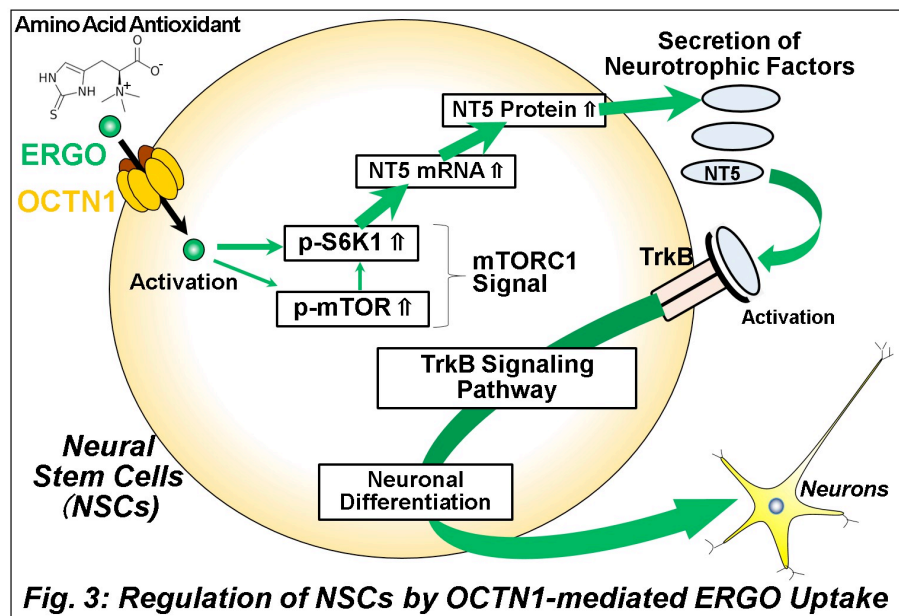


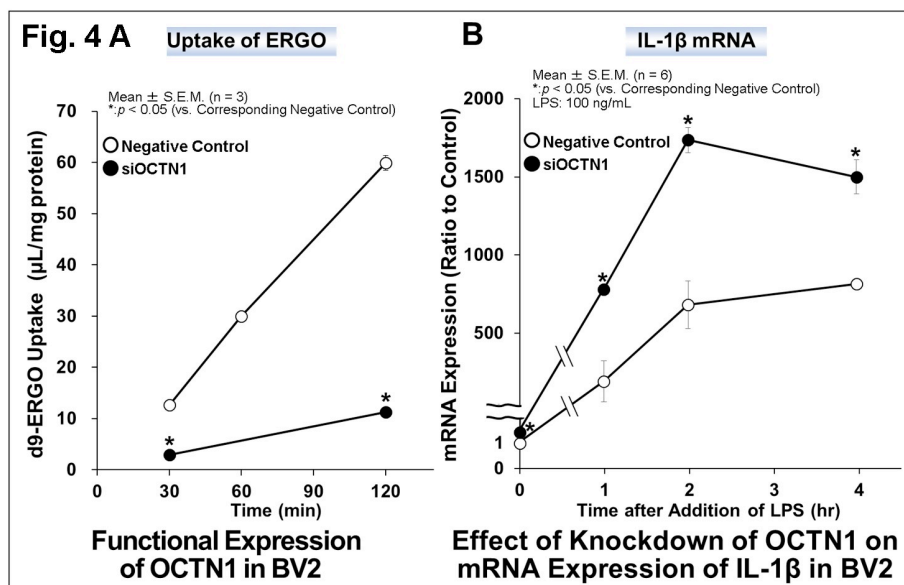
Fig. 3: Regulation of NSCs by OCTN1-mediated ERGO Uptake

活性化や NT5 の誘導による有害事象は報告されていないため、S6K1 や NT5 を標的とした治

療は、既存の精神疾患治療薬が有する種々の副作用を回避することが可能かもしれない。

2. 膜輸送体 OCTN1 によるミクログリアの機能制御

次に、MG における OCTN1 の機能的発現、生理的機能を評価した。マウスミクログリア由来細胞株 BV2 及び 0-3 日齢マウスより単離、調製した初代培養ミクログリア (PMG) を実験に用いた。BV2 に d9-ERGO を添加すると、細胞内への取り込み量は時間依存的に増加した。一方、OCTN1 の siRNA を



導入すると、d9-ERGO の取り込み活性は著しく低下した (Fig. 4A)。また、野生型 PMG (WT-PMG) においても時間依存的な [3 H]ERGO 取り込み活性が確認されたが、*octn1* 遺伝子欠損マウス由来初代培養 MG (*octn1*^{-/-}-PMG) では [3 H]ERGO の取り込みはほとんど見られなかった。LPS 刺激により BV2 を活性化し、LPS 曝露時間依存的に OCTN1 の mRNA 発現量及び [3 H]ERGO の取り込み活性が増加した。故に、MG には OCTN1 が機能的に発現しており、細胞の活性化により OCTN1 の機能が亢進することが示唆された。次に、MG の活性化における OCTN1 の関与を検討した。LPS 刺激により BV2 および PMG を活性化し、RT-PCR により主要な炎症性サイトカイン TNF α 、IL-1 β の発現を調べた。BV2 及び PMG 両者共、LPS 添加により IL-1 β 、TNF α の mRNA 発現量が顕著に増加した。BV2 において OCTN1 の siRNA を導入すると、LPS 刺激による IL-1 β mRNA の発現は対照群と比較して有意に増加したが (Fig. 4B)、TNF α の発現には変化がなかった。また、*octn1*^{-/-}-PMG における LPS 刺激後の IL-1 β mRNA の発現も、WT-PMG と比較して有意に増加した。したがって、MG に発現する OCTN1 は、IL-1 β の発現を負に制御することが示唆された。しかしながら、LPS 添加条件において、ERGO は、TNF α 、IL-1 β の発現に影響を及ぼさなかった。さらに、MG の活性化マーカーの一つである細胞体面積の測定及び、細胞体肥大化に関わる因子の活性酸素種 (ROS) を ROS 検出用蛍光試薬の DCFH-DA を用いて評価した。LPS により PMG を活性化させると、PMG の細胞体面積は有意に増加したが、一方、ERGO の添加により、細胞内 ROS 量の減少に伴い、細胞体面積の増加が有意に抑制された。以上より、MG に OCTN1 は機能的に発現しており、LPS 刺激によりその機能は亢進する。また、OCTN1 は、MG 活性化時に放出される IL-1 β の発現を負に制御し、さらに、ERGO を細胞内に取り込み細胞内 ROS を抑えることで、LPS 刺激による細胞体の肥大化を抑制することが示唆された。IL-1 β は種々の神経変性疾患の増悪に関与することが報告されていることから、ミクログリアに発現する OCTN1 を標的とした IL-1 β の発現調節が精神神経疾患治療に有用となるかもしれない。

【結論】膜輸送体 OCTN1 は、NSCs において、ERGO を細胞内に取り込むことで S6K1 (Thr389) 及び NT5/TrkB シグナルを活性化し、神経分化を促進する。また、OCTN1 はミクログリアに機能的に発現しており、炎症性サイトカイン IL-1 β の誘導及び細胞体の肥大化を負に制御する。脳の恒常性維持に重要な NSCs 及びミクログリアの機能を脳保護的に同時制御する OCTN1 は、神経新生の抑制やミクログリアの異常な活性化が認められる大うつ病等の精神神経疾患治療の新規標的分子として期待される。

審査結果の要旨

経幹細胞 (NSCs) とミクログリア (MG) は、脳の恒常性維持に重要な役割を果たす。本論文は、NSCs と MG の機能制御に関わる分子として、食物由来かつ経口摂取後脳内に到達する抗酸化物質 ergothioneine (ERGO) を輸送する膜輸送体 OCTN1/SLC22A4 に着目した。ERGO は NSCs の神経細胞への分化を促進することが、論文提出者らにより示されている。本論文では、ERGO が NSCs において神経栄養因子 NT5 を誘導し、NT5 受容体 TrkB 阻害剤が ERGO による神経分化促進作用を消失させること等が示された。また、アミノ酸センサーである mTORC1 を構成する mTOR とそのシグナル下流に位置する S6K1 のリン酸化を ERGO が増加させる一方、mTORC1 シグナル阻害剤はこれらリン酸化と神経分化促進を抑制した。以上より、OCTN1 と ERGO による神経分化促進が mTORC1 と NT5/TrkB シグナルの活性化を介することが示唆された。一方、本論文では、MG 由来細胞株 BV2 と初代培養 MG (PMG) に、OCTN1 が機能的に発現し、炎症性サイトカインの発現を負に制御することも示された。以上の知見は、種々の神経変性疾患に関連する神経新生や MG 機能の OCTN1 による制御を示唆し、創薬科学領域に有益な知見と考えられるため、審査委員会は本論文が博士（創薬科学）に値すると判断した。